

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 19 octobre 2000 (19.10.00)	
<b>Demande internationale no</b> PCT/FR00/00608	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> H18913C16CBU
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 14 mars 2000 (14.03.00)	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 15 mars 1999 (15.03.99)
<b>Déposant</b> MATHIS, Gérard etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

05 septembre 2000 (05.09.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

R. Forax

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>H18913C16CBU</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/ 00608</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>14/03/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>15/03/1999</b>
Déposant  <b>CIS BIO INTERNATIONAL</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

**4. En ce qui concerne le titre,**

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**REDUCTION DE L'EXTINCTION DE FLUORESCENCE LORS D'UN DOSAGE**

**5. En ce qui concerne l'abrégé,**

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

**6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°**

☐ suggérée par le déposant.

☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

1

☐ Aucune des figures n'est à publier.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 00/00608

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 GOIN33/58 GOIN33/533

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 GOIN C12Q C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 340 675 A (PERKIN ELMER CORP) 8 novembre 1989 (1989-11-08) le document en entier ---	1-19
A	E LOPEZ, C CHYPRE, B ALPHA, G MATHIS: "Europium(III) Trisbipyridine Cryptate Label for the Time-Resolved Fluorescence Detection of Polymerase Chain Reaction Products Fixed on a Solid Support" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 2, 1993, XP002125037 cité dans la demande figures 1,2 --- -/--	1-19

<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<p>° Catégories spéciales de documents cités:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16 juin 2000</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">27/06/2000</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Hart-Davis, J</div>



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/00608

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>I HEMMILÄ: "Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays"            CLINICAL CHEMISTRY,            vol. 31, no. 3, 1985, pages 359-370,            XP002125038            cité dans la demande            page 362, colonne 2, alinéa 2 -page 363,            colonne 2, alinéa 1            ---</p>	1-19
A	<p>G MATHIS: "Rare Earth Cryptates and Homogeneous Fluoroimmunoassays with Human Sera"            CLINICAL CHEMISTRY,            vol. 39, no. 9, 1993, pages 1953-1959,            XP002125039            cité dans la demande            le document en entier            ---</p>	1-19
A	<p>EP 0 321 353 A (ORIS SA)            21 juin 1989 (1989-06-21)            cité dans la demande            page 20, ligne 15 - ligne 41; exemple D            ---</p>	1-19
P,A	<p>FR 2 769 315 A (CIS BIO INT)            9 avril 1999 (1999-04-09)            exemples 1-6            ---</p>	1-19
A	<p>EP 0 851 228 A (LAB OF MOLECULAR BIOPHOTONICS) 1 juillet 1998 (1998-07-01)            abrégé; figure 1A            ---</p>	
A	<p>US 4 748 111 A (CROTHERS DONALD M. ET AL)            31 mai 1988 (1988-05-31)            le document en entier            -----</p>	





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00608

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0340675	A	08-11-1989	US 4962045 A	09-10-1990
			CA 1330030 A	07-06-1994
			DE 68923035 D	20-07-1995
			DE 68923035 T	19-10-1995
			JP 2017445 A	22-01-1990
			JP 2732892 B	30-03-1998
<hr/>				
EP 0321353	A	21-06-1989	FR 2624862 A	23-06-1989
			AT 76410 T	15-06-1992
			AU 2908889 A	19-07-1989
			CA 1334026 A	17-01-1995
			DE 3871353 A	25-06-1992
			ES 2043874 T	01-01-1994
			FI 92698 B	15-09-1994
			WO 8905813 A	29-06-1989
			JP 2866419 B	08-03-1999
			JP 3502575 T	13-06-1991
			KR 133732 B	21-04-1998
			RU 2074859 C	10-03-1997
			US 5457185 A	10-10-1995
			US 5534622 A	09-07-1996
			US 5162508 A	10-11-1992
			US 5346996 A	13-09-1994
<hr/>				
FR 2769315	A	09-04-1999	AU 9355698 A	27-04-1999
			WO 9918114 A	15-04-1999
<hr/>				
EP 0851228	A	01-07-1998	AU 2980397 A	07-01-1998
			WO 9747968 A	18-12-1997
<hr/>				
US 4748111	A	31-05-1988	AU 578933 B	10-11-1988
			AU 3943485 A	19-09-1985
			CA 1222706 A	09-06-1987
			DK 110885 A	13-09-1985
			EP 0154884 A	18-09-1985
			ES 541077 D	16-04-1986
			ES 8606653 A	01-10-1986
			FI 850925 A	13-09-1985
			IL 74539 A	31-01-1989
			JP 60226900 A	12-11-1985
			NO 850769 A	13-09-1985
			NZ 211366 A	30-05-1988
			ZA 8501797 A	27-11-1985

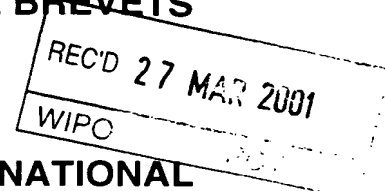


# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS



## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



15T

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>H18913C16CBU</b>		<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° <b>PCT/FR00/00608</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>14/03/2000</b>	Date de priorité (jour/mois/année) <b>15/03/1999</b>	
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB <b>G01N33/58</b>			
Déposant <b>CIS BIO INTERNATIONAL</b>			
1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.  2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.  <input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).  Ces annexes comprennent feuilles.			
3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants: <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale  <b>05/09/2000</b>		Date d'achèvement du présent rapport  <b>22.03.2001</b>	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:   Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé  <b>Thiele, U</b>  N° de téléphone +49 89 2399 8643  	



.

,

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00608

## I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17.)*) :

### Description, pages:

1-27                      version initiale

### Revendications, N°:

1-19                      version initiale

### Dessins, feuilles:

1/1                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00608

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 18,19
	Non : Revendications 1-17
Activité inventive	Oui : Revendications 18
	Non : Revendications 19
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**





**Section V**

- 1) Il est fait référence au document suivant:

D1 EP-A-0 321 353 (ORIS SA) 21 juin 1989 (1989-06-21) cité dans la demande à la page 2

- 2) La présente demande ne répond pas au critère figurant à l'Article 33(2) PCT, l'objet de la revendication 1 n'étant pas nouveau au vu de l'état de la technique tel qu'il est défini dans le règlement d'exécution (Règle 64(1)-(3) PCT).
- a) Il apparaît que la présente invention (voir pages 2 et 3) a pour objet un nouveau marqueur constitué d'un conjugué cryptate-oligonucléotide, qui peut être couplé à une molécule biologique, tel qu'un anticorps ou la streptavidine, ayant un rôle de reconnaissance et pouvant se lier à un partenaire. Lesdits conjugués en trois parties présentent des propriétés avantageuses en comparaison des conjugués cryptate-anticorps ou cryptate-streptavidine.
- b) Présentement, cependant, l'utilisation de la partie ADN d'un conjugué en deux parties pour la détection d'un analyte complémentaire à ladite partie ADN n'est pas exclue dans la revendication 1.
- c) Ainsi, le contenu du document D1 (voir en particulier page 20, lignes 38 à 41) enlève la nouveauté de cette revendication, puisqu'il décrit l'utilisation de sondes ADN couplées à un cryptate de terre rare d'un même genre que celui de la présente demande, pour la détection et le dosage d'une séquence d'acide nucléique complémentaire. Par conséquent, inévitablement, le procédé selon D1 a pour effet une réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure. Un procédé décrit avec toutes ses caractéristiques techniques n'est pas rendu nouveau par le fait que l'on indique un avantage opératoire qui y est lié mais qui n'avait pas été jusqu'alors reconnu par les spécialistes, et qui se manifeste lors de la réalisation du procédé non modifié.
- 3) Les revendications dépendantes 2 à 17 et 19 ne contiennent aucune caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des



revendications à laquelle elles se réfèrent, définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT en ce qui concerne la nouveauté (revendications 2 - 17; voir D1) et/ou l'activité inventive (Art. 33(2), (3) PCT).

Les caractéristiques de la revendication 19 sont déjà employées dans le même but dans le même domaine technique.

- 4) Le procédé objet de la revendication 18 est considéré comme étant nouveau (Article 33(2) PCT), car il n'est décrit dans aucun des documents cités dans le rapport de recherche internationale.

D'autre part, étant donné qu'aucun desdits documents pris en considération isolément ou en combinaison, ne suggère pas l'effet avantageux mentionné au point 2a) ci-dessus, il est également considéré que l'objet de la revendication 18 implique une activité inventive (Art. 33(3) PCT).



Translation  
09/936563

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H18913C16CBU	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00608	International filing date (day/month/year) 14 March 2000 (14.03.00)	Priority date (day/month/year) 15 March 1999 (15.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/58, 33/533		
Applicant CIS BIO INTERNATIONAL		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 September 2000 (05.09.00)	Date of completion of this report 22 March 2001 (22.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00608

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-19, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00608

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	18, 19	YES
	Claims	1-17	NO
Inventive step (IS)	Claims	18	YES
	Claims	19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Reference is made to the following document:

D1: EP-A-0 321 353 (ORIS SA) 21 June 1989 (1989-06-21), cited on page 2 of the application.

#### 2. The present application does not meet the criteria of PCT Article 33(2), as the subject matter of Claim 1 is not novel over the prior art as defined in the Regulations (PCT Rule 64.1-64.3).

a) It appears that the present invention (see pages 2 and 3) relates to a novel marker consisting of a cryptate-oligonucleotide conjugate, capable of being coupled to a biological molecule, such as an antibody or streptavidine, having a recognition function and capable of binding to a partner. Said three-part conjugates exhibit advantageous properties in relation to cryptate-antibody or cryptate-streptavidine conjugates.

b) At the present time, however, the use of the DNA portion of a two-part conjugate to detect an analyte complementary to said DNA portion is not excluded from Claim 1.



c) Thus, the content of document D1 (see in particular page 20, lines 38 to 41) takes away the novelty of said claim, since it describes the use of DNA probes coupled to a rare earth cryptate of the same kind as that of the present application, for detecting and assaying a complementary nucleic acid sequence. Consequently, and inevitably, the method according to D1 has the effect of reducing the fluorescence quenching caused by the assay medium. A method described with all the technical features thereof does not become novel by virtue of the fact that an operational advantage related thereto is disclosed, which advantage had not been heretofore recognised by experts and is obtained by carrying out the method without any modifications.

3. Dependent Claims 2 to 17 and 19 do not contain any feature which, in combination with those of any of the claims to which they refer, defines subject matter which meets the PCT requirements with respect to novelty (Claims 2-17; see D1) and/or inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

The features of Claim 19 have already been used for the same purpose in the same technical field.

4. The method of Claim 18 is considered to be novel (PCT Article 33(2)), since it is not described in any of the documents cited in the international search report.

Moreover, since none of said documents, taken alone or in combination, suggests the advantageous effect mentioned in point 2a) above, it is also considered



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 00/00608

that the subject matter of Claim 18 involves an  
inventive step (PCT Article 33(3)).





## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>G01N 33/58, 33/533</b>		(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/55630</b>
A1		(43) Date de publication internationale: 21 septembre 2000 (21.09.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00608 (22) Date de dépôt international: 14 mars 2000 (14.03.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/03150                      15 mars 1999 (15.03.99)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; RN 306, F-91400 Saclay (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MATHIS, Gérard [FR/FR]; 17, impasse Capelle des Ladres, F-30200 Bagnols sur Cèze (FR). BAZIN, Hervé [FR/FR]; 14, allée de la Chenaie, F-30400 Villeneuve les Avignon (FR). TRINQUET, Eric [FR/FR]; Chemin Columbia, F-30130 Pont Saint Esprit (FR). (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de L'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: METHOD FOR REDUCING FLUORESCENCE QUENCHING IN BIOASSAYS

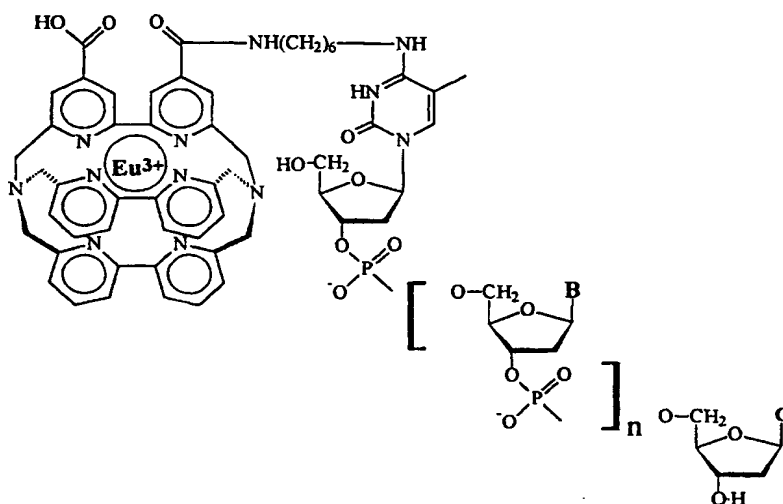
(54) Titre: REDUCTION DE L'EXTINCTION DE FLUORESCENCE LORS D'UN DOSAGE

## (57) Abstract

The invention concerns a method for reducing fluorescence quenching due to the measuring medium, in a fluorescence bioassay of an analyte using at least a fluorescent marker. The invention is characterised in that it consists in introducing in the measuring medium a fluorescent conjugate comprising an oligonucleotide bound to a rare earth cryptate.

## (57) Abrégé

L'invention concerne un procédé de réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure, dans un dosage par fluorescence d'un analyte mettant en oeuvre au moins un marqueur fluorescent, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de mesure un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare.



Conjugué KH-ODN1

KH-ODN1 CONJUGATE

B = Adénine (A), Guanine (G), Cytosine (C), Thymine (T)  
ADENINE (A), GUANINE (G), CYTOSINE (C), THYMINE (T)

C = Cytosine  
CYTOSINE

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						



## REDUCTION DE L'EXTINCTION DE FLUORESCENCE LORS D'UN DOSAGE

L'invention concerne l'utilisation d'un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare pour réduire l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure, dans un dosage par fluorescence d'un  
5 analyte mettant en œuvre au moins un marqueur fluorescent.

L'avancée des connaissances en biologie crée un besoin croissant pour des méthodes de diagnostic permettant de suivre ou de quantifier des biomolécules.

Dans le même temps, on observe une désaffection vis à vis des marqueurs radioactifs qui sont généralement impliqués dans les méthodes de  
10 dosage de référence. D'une façon générale, on cherche actuellement à remplacer les traceurs radioactifs par d'autres marqueurs et principalement par des marqueurs fluorescents. L'utilisation de marqueurs fluorescents dans des conditions idéales permet d'obtenir des sensibilités élevées théoriquement équivalentes à celles obtenu par les traceurs radioactifs.

15 Dans la pratique, les performances des traceurs fluorescents sont limitées, d'une part, par la présence d'un bruit de fond souvent élevé et, d'autre part, par le fait qu'ils sont généralement très sensibles aux changements dans leur environnement. Des petites modifications du pH, de la polarité, de la présence d'oxygène dissous, de la proximité d'atome lourds (iode par exemple) ou de  
20 groupes absorbants peuvent modifier leur rendement quantique (dans le sens d'une exaltation ou d'une extinction) ou déplacer la longueur d'onde de l'émission.

Il est connu que l'interaction avec des protéines présentes dans le sérum provoque souvent une extinction (« quenching ») de la fluorescence.

Les problèmes inhérents aux méthodes d'analyse par mesure de la  
25 fluorescence sont répertoriés dans un article de revue (I. Hemmilä, Clin. Chem. 31/3, 359-370 (1985)).

Les problèmes inhérents au bruit de fond provenant de la fluorescence intrinsèque des protéines ainsi que des autres biomolécules présentes dans les échantillons biologiques peut être résolu par l'utilisation de marqueurs fluorescents  
30 formés par des complexes de terres rares (principalement l'Europium) qui permettent une sélection temporelle du signal spécifique. Les durées de vie particulièrement longues (0,1ms à 1ms environ) qui caractérisent les complexes d'Europium permettent, à l'aide d'une mesure en temps résolu, de s'affranchir du bruit de fond provenant, par exemple, des protéines sériques qui lui, est caractérisé par une  
35 durée de vie relativement courte (environ 4ns).

Le marquage indirect d'acides nucléiques par un cryptate trisbipyridine-Europium [TBP-(Eu<sup>3+</sup>)] (cryptate décrit dans le brevet EP 0321353) a été réalisé par l'intermédiaire d'un anticorps anti-DNP marqué par ce cryptate, le groupe dinitrophényle (DNP) étant introduit à l'extrémité 5' d'oligonucléotides synthétiques  
5 (E. Lopez et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993)).

L'utilisation d'anticorps marqués à l'aide d'un cryptate TBP-(Eu<sup>3+</sup>) s'est par ailleurs étendu au domaine de l'immunodiagnostic. L'utilisation d'un cryptate comme marqueur a permis de développer des immuno-essais de type homogène basés sur une mesure de fluorescence en temps résolu associé à un transfert d'énergie non  
10 radiatif (G.Mathis et al., Clin. Chem, 39, 1251 (1993)).

Un format de type homogène présente l'intérêt considérable de pouvoir suivre en temps réel la cinétique de formation d'un complexe immunologique, mais ne permet cependant pas de s'affranchir des interactions éventuellement défavorables entre le marqueur et les molécules présentes dans un milieu  
15 biologique (extinction de la fluorescence).

Dans un milieu sérique, on peut obtenir une restauration des propriétés photophysiques, et notamment de la durée de vie, en ajoutant des ions fluorures au milieu comme décrit dans la demande WO92/01224.

On a maintenant trouvé que le fait de conjuguer une molécule de cryptate  
20 de terre rare à une chaîne oligonucléotidique permet d'obtenir un conjugué fluorescent cryptate-oligonucléotide qui présente des propriétés photophysiques nouvelles et inattendues.

Ledit conjugué présente la propriété avantageuse d'être moins sensible, comparativement au cryptate seul, au phénomène d'extinction de la fluorescence  
25 résultant d'une interaction avec des molécules présentes dans le milieu.

Cette observation présente un grand intérêt puisqu'elle permet de réaliser des mesures de fluorescence dans des milieux biologiques sans utilisation d'un adjuvant comme les ions fluorures.

Les conjugués cryptate-oligonucléotides constituent donc de nouveaux  
30 marqueurs, qui peuvent être couplés à une molécule biologique ayant un rôle de reconnaissance et pouvant se lier à un partenaire.

Le conjugué cryptate-oligonucléotide couplé à un récepteur tel qu'un anticorps ou la streptavidine garde ses propriétés photophysiques (résistance à

l'extinction) et présente des propriétés avantageuses en comparaison des conjugués cryptate-anticorps ou cryptate-streptavidine.

L'invention concerne donc, selon un premier aspect, un procédé de réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure, dans un dosage  
5 par fluorescence d'un analyte mettant en œuvre au moins un marqueur fluorescent, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de mesure un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare.

Dans un aspect avantageux, le conjugué fluorescent est lui-même utilisé comme seul marqueur ou comme l'un des marqueurs fluorescents dans le dosage.

10 Par « analyte », on entend dans la présente description toute substance ou groupe de substances, ainsi que ses ou leurs analogues, que l'on souhaite détecter et/ou déterminer.

Le procédé selon l'invention trouve une application importante dans les procédés de dosage dits par compétition ou par excès, en phase homogène.

15 Dans la suite de la description, la notion de « cryptate » ainsi que la nomenclature des macrocycles et polycycles utilisables sont telles que définies par J.M. Lehn dans Struct. Bonding (Berlin), 16, 1, 1973 et dans Acc. Chem. Res. 11, 49, (1978).

Par « oligonucléotide », on entend dans la présente description :

20 - soit un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester ;

- soit un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides ou d'unités analogues de nucléotides modifiées sur le sucre ou sur la base et liées entre elles par des liaisons internucléotidiques naturelles de type phosphodiester,  
25 une partie des liaisons internucléotidiques étant éventuellement remplacée par des liaisons phosphonate, phosphoramide ou phosphorothioate. Ces différentes familles d'oligonucléotides sont décrites dans Goodchild, *Bioconjugate Chemistry*, 1(3), May/June 1990, 77-99 ;

- soit un enchaînement comprenant à la fois des unités ribonucléotides ou  
30 désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et des unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amides, communément dénommés « PNA » (en anglais « peptide nucleic acid »), tel que décrit dans M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895-1897 ; de tels composés sont par exemple décrits dans R. Vinayak et al., *Nucleoside &*  
35 *Nucleotide*, 1997, 16 (7-9), 1653-1656.

L'utilisation de chacun de ces types d'oligonucléotides constitue un aspect avantageux de l'invention.

On entend par « analogue » de nucléotide ou de nucléoside un nucléotide/nucléoside comportant au moins une modification portant sur le sucre ou la  
5 nucléobase ou une combinaison de ces modifications. A titre d'exemple, on peut citer les modifications suivantes :

I. Modifications concernant le sucre (analogues de nucléotides ou de nucléosides) :

10 1°) La partie sucre peut être modifiée en ce que la configuration des hydroxyles (libres ou engagés dans un pont phosphate) est différente de la configuration naturelle (qui est respectivement  $\beta$ -D-*érythro* en série ADN et  $\beta$ -D-*ribo* en série ARN) comme dans les analogues ayant le squelette  $\beta$ -D-*arabino*-pentofuranoside ou  $\beta$ -D-*xylo*-pentofuranoside, par exemple.

15 2°) La structure peut être modifiée en ce que les liaisons internucléotidiques sont de type 2'  $\rightarrow$  5', tel que dans le cas des dérivés  $\beta$ -D-*ribo*-pentofuranoside-2'-phosphate ou 3'-désoxy- $\beta$ -D-*érythro*-pentofuranoside-2'-phosphate.

Il existe des nucléotides dont la structure regroupe les deux modifications précédentes, tel que le  $\beta$ -D-*xylo*-pentofuranoside-2'-phosphate.

20 3°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que la configuration du carbone 4' est opposée, c'est le cas  $\alpha$ -L-*thréo*-pentofuranoside-3'-phosphate. La différence peut porter sur la configuration du carbone en 1' (position anomérique) c'est le cas du  $\alpha$ -D-*érythro*-pentofuranoside-3'-phosphate. Il existe des nucléotides/nucléosides dont la structure regroupe les deux modifications précédentes, tel que  
25 le  $\beta$ -L-*thréo*-pentofuranoside-3'-phosphate.

4°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que l'oxygène en 4' est remplacé par un carbone (analogue carbocyclique) ou par un soufre tel que le 4'-Thio-  $\beta$ -D-*érythro*-pentofuranoside-3'-phosphate.

5°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que l'un des  
30 hydroxyle du sucre est alkylé, par exemple dans le squelette 2'-O-Alkyl- $\beta$ -D-*ribo*-pentofuranoside-3'-phosphate, le groupe alkyle pouvant être par exemple le groupe méthyle ou allyle.

6°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que seule la partie sucre est conservée comme dans le 1,2-didésoxy-D-érythro-pentofuranose-3-phosphate, ou en ce que le sucre est remplacé par un polyol comme le propanediol.

5 II. Modifications concernant la nucléobase (analogues de nucléotide) :

1°) La nucléobase peut être modifiée en ce que les substituants des bases naturelles sont modifiés comme dans la 2,6-diaminopurine, l'hypoxanthine, la 4-Thio-thymine, le 4-Thio-uracil, ou le 5-Ethynyl-uracil.

10 2°) Les positions des substituants peuvent être permutées par rapport aux bases naturelles tel que dans l' Isoguanosine ou l'Isocytosine.

3°) Un atome d'azote de la nucléobase peut être remplacé par un carbone comme dans la 7-Déaza-guanosine, la 7-Déaza-adénine.

15 Par ailleurs, comme mentionné ci-dessus, les liaisons entre les unités sucres ou leurs analogues peuvent également être modifiées, par exemple en remplaçant un ou plusieurs des atomes d'oxygène de la liaison phosphodiester naturelle par un carbone (série phosphonates), un azote (série phosphoramides), ou un soufre (phosphorothioates).

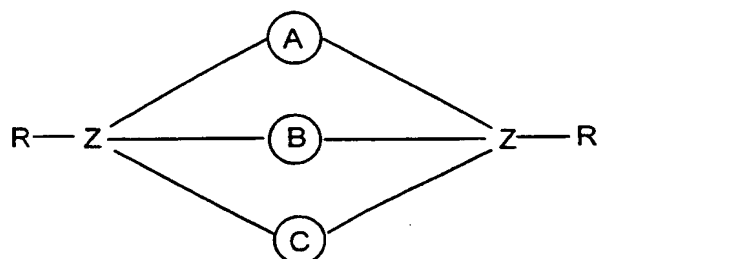
20 Avantageusement, l'oligonucléotide du conjugué selon l'invention est constitué d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides, dont l'une peut comporter un groupe fonctionnel introduit ou généré sur ladite unité ou un groupe fonctionnel introduit à l'aide d'un bras d'espacement lié au groupement phosphate terminal en position 3' ou 5'.

25 Selon un aspect préféré, ladite unité est l'unité 5' terminale ou 3' terminale.

L'oligonucléotide utilisable selon l'invention comprendra de préférence un enchaînement de 5 à 50 nucléotides ou un enchaînement de 5 à 50 nucléotides et analogues de nucléotides ou de nucléosides tels que définis ci-dessus.

30 Selon un aspect particulier de l'invention, on utilisera un oligonucléotide constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester, et d'unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide, ledit oligonucléotide comprenant au moins 5 liaisons internucléotidiques de type phosphodiester à l'extrémité destinée à être liée au cryptate.

Selon un aspect préféré, ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule



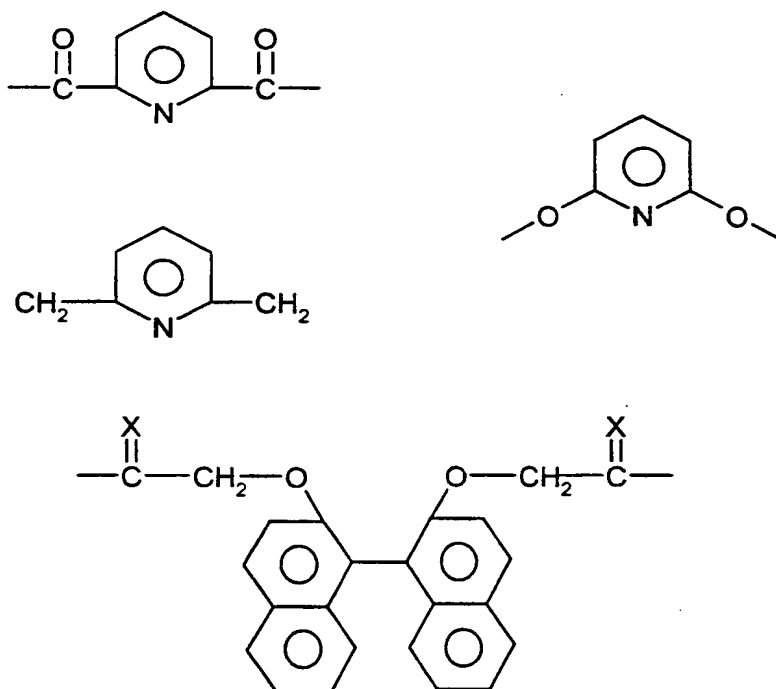
5

dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

15 En particulier, ledit cryptate de terre rare répond à la formule (I) dans laquelle le motif moléculaire est choisi parmi la phénanthroline, l'anthracène, le benzène, le naphthalène, les bi- et ter-phényle, l'azobenzène, l'azopyridine, la pyridine, les bipyridines, les bisquinoléines et les composés de formules ci-après :

20 - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> - X<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> - X<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> -  
 - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> - X<sub>1</sub> - CH<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> - CH<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> -

X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> pouvant être identiques ou différents désignent l'oxygène, l'azote ou le soufre,



X étant l'oxygène ou l'hydrogène.

Avantageusement, ledit cryptate de terre rare est constitué d'un sel de terre rare complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

(22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ; (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ; (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-bipyridine diphénylbipyridine.

De tels composés sont par exemple décrits dans le brevet EP 180 492.

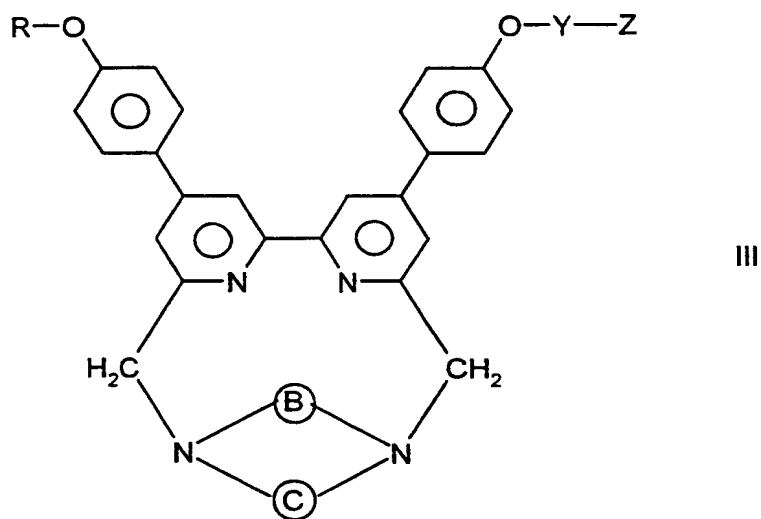
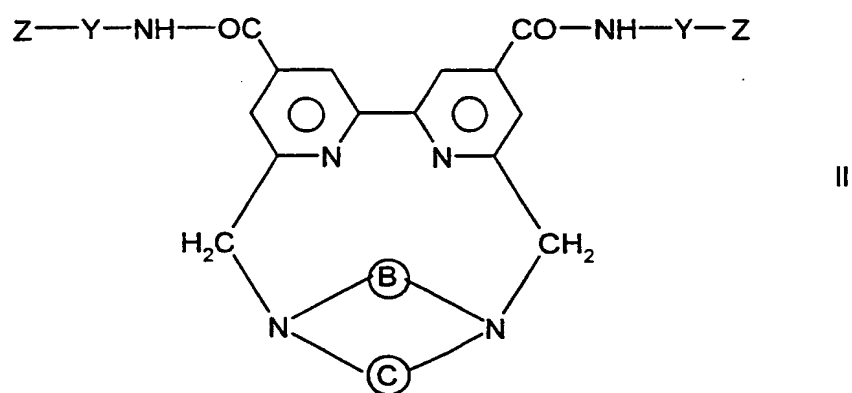
On peut également utiliser des composés macropolycycliques cryptates complexant des ions de terre rare dans lesquels le motif moléculaire est choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrazines sont décrits dans F. Bodar-Houillon et al., New J. Chem., 1996, 20, 1041-1045.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrimidines sont décrits dans J. M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1992, 75, 1221.

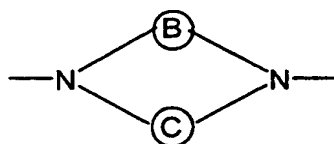
Des composés macropolycycliques comprenant des hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes sont décrits dans J.M. Lehn et al., *Helv. Chim. Acta*, 1991, 74, 572.

- Selon un autre aspect avantageux, ledit cryptate de terre rare est constitué
- 5 d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :



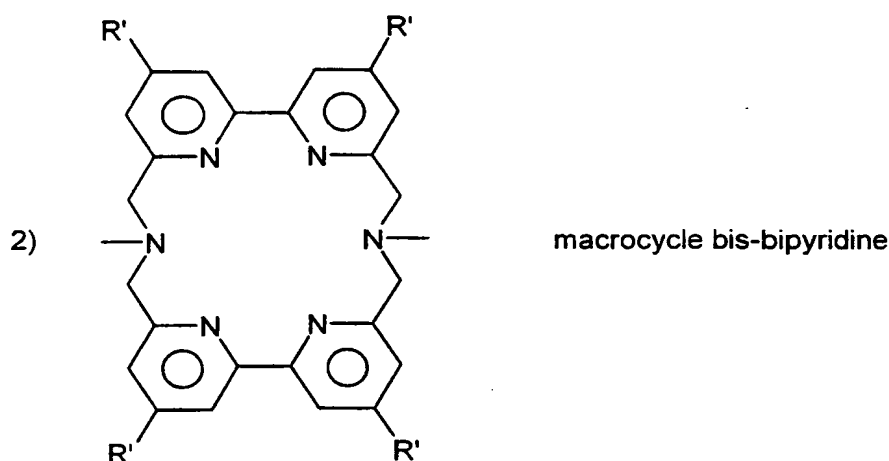
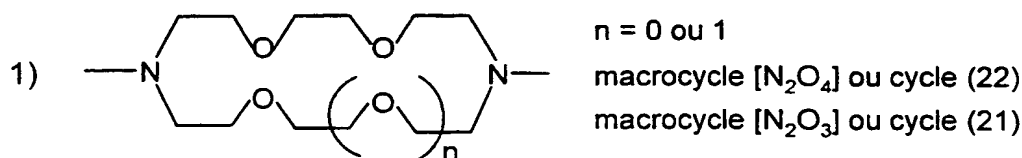
dans lesquels :

- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :





5

- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en  $C_1$  à  $C_{20}$  contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou éventuellement contenant par un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; parmi les groupes cycloalkylène en  $C_5$  à  $C_8$  ou parmi les groupes arylène en  $C_6$  à  $C_{14}$ , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

15 - Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_{10}$  et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

20

Selon un aspect préféré, le cryptate de terre rare du conjugué fluorescent utilisé selon l'invention est un cryptate d'uropium.

Dans un aspect avantageux, ledit cryptate de terre rare est le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine ou Eu [bis-diéthoxybipyridine.bipyridine] .

Le cryptate de terre rare est de préférence lié de manière covalente à l'oligonucléotide soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

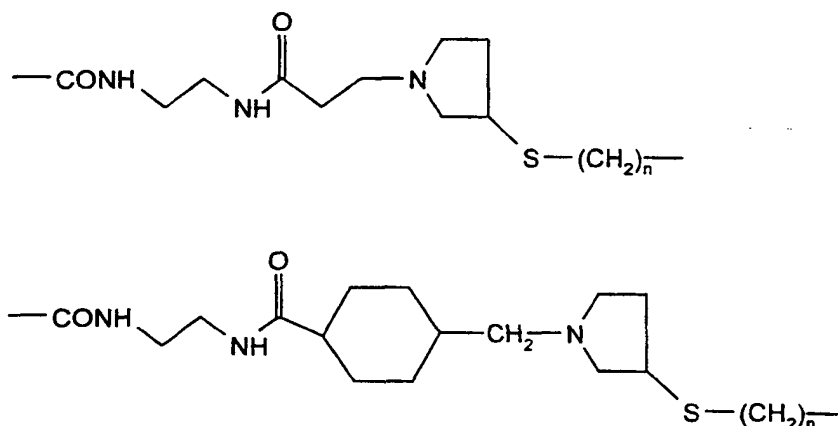
5 Par « liaison directe », on entend la liaison du marqueur fluorescent sur un groupe fonctionnel préalablement introduit ou généré sur un ou plusieurs atomes d'une base ou d'une unité pentofuranose de l'oligonucléotide.

Dans la présente description, on désigne par groupe fonctionnel toute fonction portée par la partie nucléotidique ou introduite sur cette partie par toute  
10 méthode connue par l'homme du métier et capable de se lier par liaison covalente, directement ou après activation avec une fonction présente sur le cryptate ou sur le bras espaceur porté par le cryptate. De tels groupes fonctionnels sont notamment les fonctions NH<sub>2</sub>, COOH, CHO, OH ou SH ainsi que les fonctions capables de donner des liaisons covalentes par substitution (halogénures, sulfonates, époxyde)  
15 ou par addition (double liaisons type maléïmide). Ces fonctions sont généralement portées par une chaîne hydrocarbonée elle-même reliée à la partie nucléotidique.

Des méthodes d'introduction de ces groupes fonctionnels sont notamment décrites dans C. Kessler, Nonisotopic probing, Blotting and Sequencing, 2<sup>nd</sup> edition, L.J. Kricka (1995), Ed. Academic press Ltd., Londres, p. 66-72. Selon un aspect  
20 préféré de l'invention, le cryptate de terre rare est lié à l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement . On entend par « bras d'espacement » tout moyen permettant de lier de façon covalente l'oligonucléotide avec le cryptate au niveau d'un phosphate terminal, d'un atome d'une base purique ou pyrimidique ou d'un atome du sucre.

25 Dans un aspect avantageux, ledit bras d'espacement est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle  
30 ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> et les groupes arylène en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonat .

En particulier, le bras d'espacement est choisi parmi les groupes de formules :



dans lesquelles  $n = 2$  à  $6$ , et  $-CONH-(CH_2)_6-$ ,

la liaison via le groupe  $-CONH$  ayant lieu au niveau du cryptate.

Selon un aspect ultérieur de l'invention, le conjugué fluorescent est lié de manière covalente à l'un des membres d'un couple de molécules capable de se lier spécifiquement entre elles, comme par exemple un couple antigène/anticorps, ligand/récepteur cellulaire, biotine/avidine, acide nucléique (notamment un ARN ou un ADN mono- ou bi-caténaire, ou un oligonucléotide mono- ou bi-caténaire) et l'acide nucléique comportant des bases complémentaires à celui-ci.

Selon un aspect du procédé selon l'invention, la fluorescence du conjugué fluorescent utilisé comme marqueur est émise directement par le marqueur fluorescent, après excitation à une longueur d'onde donnée.

Selon un autre aspect du procédé selon l'invention, on met en œuvre dans le dosage, outre ledit conjugué fluorescent, un autre marqueur fluorescent. Dans ce cas, la fluorescence mesurée dans le dosage est émise de manière indirecte par un transfert d'énergie non radiatif entre le conjugué après excitation dit « composé donneur » et une autre molécule fluorescente dite « composé accepteur ».

Dans ce cas particulier, les conditions suivantes sont remplies :

- d'une part, le composé fluorescent accepteur possède un spectre d'absorption qui recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du donneur et présente une absorbance molaire élevée dans cette zone de recouvrement, et un spectre d'émission dans une gamme de longueur d'ondes où le donneur présente une émission intrinsèque faible ;

- d'autre part, l'accepteur et le donneur se situent à proximité l'un de l'autre, l'orientation de leurs dipôles de transition étant approximativement parallèles.

Le principe de la technique de transfert d'énergie non radiatif est décrit notamment dans G. Mathis et al., Clin. Chem., 1993, 39, 1953-1959.

Le cryptate de terre rare lié à l'oligonucléotide au sein du conjugué, qui est le composé fluorescent donneur, peut être dans ce cas un cryptate d'euporium, et  
5 le composé fluorescent accepteur peut être par exemple choisi parmi l'allophycocyanine, l'allophycocyanine B, la C phycocyanine ou la R phycocyanine.

L'invention est illustrée par les exemples ci-après, dans lesquels on utilisera les abréviations suivantes :

- 10 BSA : sérum albumine bovine  
DTT : dithiothréitol  
SMCC : ester N-hydroxysuccinimide de l'acide 4-(N-maléimidométhyl)  
cyclohexane-1-carboxylique  
SMP : ester N-hydroxysuccinimide de l'acide 3-maléimidopropionique  
15 SPDP : N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate  
SVNN : sérum de veau nouveau-né  
TEAB : hydrogénocarbonate de triéthylammonium  
TEA Ac : Acétate de triéthylammonium contenant 10 % d'acétonitrile.  
TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine.

20

**EXEMPLE 1. Propriétés photophysiques d'un cryptate [TBP-(Eu3+)] libre en présence de sérum:**

Méthode A: Les spectres de fluorescences et les durées de vie sont  
25 mesurées sur un Spectrofluorimètre Perkin-Elmer de type LS50.

On prépare une solution mère (concentration de  $9 \cdot 10^{-6}$  M dans du tampon phosphate 100 nM, pH 7) de cryptate [TBP-(Eu3+)]-diamine (purifié par RP-HPLC sur une colonne C-18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'eau contenant 1 % d'acide trifluoroacétique, puis séché sous vide) préparé par réaction de  
30 l'éthylènediamine sur le cryptate [(bis-bpy)-(bpy-dimethylester)] décrit dans l'exemple 4, section A de la demande EP 0 321 353. Dans les exemples suivants, ce cryptate [TBP-(Eu3+)]-diamine sera abrégé par K-NH2.

1°) On dilue 200µl de cette solution mère dans 400µl de tampon phosphate 100mM pH7 et on mesure le spectre de fluorescence ( $t_d = 0,1\text{ms}$ ,  $t_g = 0,4\text{ms}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}} = 306\text{nm}$   $\lambda_{\text{émission}} = 540 \text{ à } 750\text{nm}$ , fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'émission) ainsi que la durée de vie  $t$  ( $t_d = 0,1 \text{ à } 0,6 \text{ ms}$ ,  $t_g = 0,4\text{ms}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}} = 306\text{nm}$   $\lambda_{\text{émission}} = 620\text{nm}$ , fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'émission):

On observe que la raie principale ( $\lambda_{\text{em}} = 616\text{nm}$ ) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de  $t_p = 0,60\text{ms}$  (Coefficient de Corrélation C.C = 0,999).

2°) On dilue 200µl de cette solution mère de K-NH<sub>2</sub> dans un mélange de 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 et de 200µl de SVNN et on mesure le spectre et la durée de vie dans les mêmes conditions.

On observe que la raie principale ( $\lambda_{\text{em}} = 616\text{nm}$ ) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de  $t_s = 0,15\text{ms}$  (C.C = 0,991).

Le facteur d'extinction est donné par l'expression  $Q = 100 - 100(t_s/t_p)$  soit  $Q = 100 - 100(0,15/0,60) = 75$  soit 75% d'extinction.

#### Méthode B :

On prépare une solution mère de cryptate [TBP-(Eu<sup>3+</sup>)]-diamine dans du tampon phosphate 100mM à une concentration de  $1,8 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ .

On remplit les puits d'une microplaque à fond noir (HTRF 96 puits, Packard) selon le protocole suivant :

Conditions 1 : On mélange 100µl de solution mère de cryptate avec 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 et 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA, les mesures sont effectuées en doublet. Ce milieu permet de constituer une référence.

Conditions 2 : On mélange 100µl de solution mère de cryptate avec 100µl de SVNN et 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA (mesure en doublet).

On mesure la fluorescence en temps résolu sur un appareil DISCOVERY (Packard) utilisant une excitation laser à 337nm et une fenêtre d'acquisition de 50µs à 400µs.

Dans le tampon phosphate seul (conditions 1), on observe que l'intensité de l'émission à 620nm est de  $1,41 \cdot 10^5$  ufa (unités de fluorescence arbitraires). Dans

les puits adjacents d'une même microplaque, les solutions contenant du sérum (conditions 2) présentent une intensité de l'émission à 620nm de  $2,9 \cdot 10^4$  ufa.

La baisse de l'intensité du signal à 620nm en présence de sérum par rapport à la référence dans le tampon phosphate permet de mettre en évidence le  
5 phénomène d'extinction provoqué par le sérum.

$$100 - 100[E_{620}(\text{sérum}) / E_{620}(\text{réf})] = 100 - 100(2,9 \cdot 10^4 / 1,41 \cdot 10^5) = 80\%$$

Cette méthode permet une estimation globale de la diminution du signal provenant soit d'une diminution de la durée de vie soit d'une diminution de l'émission à 620nm.

10 Elle permet de travailler à des concentrations plus faibles comparativement à la méthode A et elle permet une mesure simultanée de plusieurs échantillons en se plaçant dans des conditions les plus proches possible de celles rencontrées dans un immuno-essai.

## 15 **EXEMPLE 2. Synthèse et purification d'un conjugué oligodésoxynucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)]:**

1°) Synthèse d'un oligodésoxynucléotide fonctionnalisé par un bras aminohexyl (AH-ODN1):

20 Un oligodésoxynucléotide (ODN) de séquence  $5'\text{-}^{AH}\text{C ACG CCA CTA GCT CC-}_3'$  modifié en son extrémité 5' par un bras aminohexyl (AH) est synthétisé sur support solide par la méthode dénommée « phosphite-phosphoramidite » en utilisant un synthétiseur d'ADN (Applied Biosystems type 392) selon le protocole du fabricant. Un nucléotide modifié est introduit en 5' par couplage d'un dérivé N,N-  
25 diisopropyl-β-cyanoéthyl-phosphoramidite obtenu à partir de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-Trifluoracétamidohexyl)-2'-désoxycytidine préparée par trifluoracétylation de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-Aminohexyl)-2'-désoxycytidine comme décrit dans ROGET et al. Nucleic Acids Res., 17, 7643-7650, (1989).

Après synthèse sur un synthétiseur d'ADN (Applied Biosystem 392) en  
30 mode "trityl-on" suivant le guide utilisateur correspondant, l'oligonucléotide est traité par l'ammoniaque concentrée (16h à 55°C) et purifié par HPLC sur une colonne LiChrospher<sup>R</sup> RP-18E 250-10 (10µm)(Merck, Darmstadt, D) par un gradient d'acétonitrile dans l'acétate de triéthylammonium 50 mM (tampon A: 5% acétonitrile, tampon B: 50% acétonitrile; débit 5ml/min, gradient de 10% B à 60% B en 20min,

isocratique 60% B pendant 5min, puis gradient de 60% B à 100% B en 5min). Selon la méthode décrite dans Oligonucleotide synthesis : A practical approach. Ed M.J. Gait. IRL Press, Oxford. Les fractions correspondant à un pic majoritaire (temps de rétention supérieur à 20min) sont évaporées. Après évaporation et co-  
5 évaporation avec de l'eau, l'oligonucléotide partiellement déprotégé ainsi obtenu est détritylé par l'acide acétique à 80% (température ambiante, 30min) puis, après évaporation et coévaporation, l'oligonucléotide complètement déprotégé est repris dans 50µl d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (TEAB) 100mM pH 8 et précipité par 1,5ml de n-butanol. Après centrifugation le surnageant est éliminé et le  
10 précipité séché sous vide est repris par 200µl d'eau. Cette solution mère (oligonucléotide dénommé AH-ODN1) présente une absorption de 37 UA<sub>260</sub>/ml.

2°) Couplage d'une molécule de cryptate [TBP-(Eu3+)] sur un oligodésoxynucléotide fonctionnalisé par un bras aminohexyl (AH-ODN1):

15 Une partie aliquote (150µl) de la solution mère de l'oligonucléotide obtenu ci-dessus (5,5 UA<sub>260</sub> soit environ 39 nmol) est diluée par 150µl d'une solution aqueuse de TEAB 0,1 M pH 7,8 et on ajoute 60 µl d'une solution de cryptate [TBP-(Eu3+)] activé (4 mg/ml) soit 171 nmol (environ 4 équivalents). Le cryptate [TBP-(Eu3+)] activé (N-hydroxysuccinimide/dicyclohexylcarbodiimide) est préparée  
20 extemporanément à partir de cryptate d'Europium [(bis-bipy)-(bipy-diacide)] lui-même obtenu à partir du cryptate d'Europium [(bis-bipy)-(bipy-dimethylester)] décrit dans l'exemple 4, section A, de la demande EP 0 321 353.

Après 30 min sous agitation, on ajoute 15µl de TEAB 1M pH 8,5 puis évapore sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 200 µl, on dépose sur une  
25 colonne NAP10 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon TEAAc 25mM pH7 contenant 10% d'acétonitrile, on élue par le même tampon selon le protocole du fabricant, la fraction exclue est collectée dans un volume de 1ml, cette fraction est concentrée (speed-vac) jusqu'à un volume de 200µl.

3°) Purification d'un conjugué formé d'un cryptate [TBP-(Eu3+)] et d'un  
30 oligodésoxynucléotide fonctionnalisé par un bras aminohexyl (Conjugué KH-ODN1):

Le conjugué KH-ODN1 est analysé par FPLC sur un colonne mono-Q (Pharmacia) en utilisant les conditions suivantes (tampon C : sodium acétate 20mM pH 5 contenant 10% d'acétonitrile. tampon D : sodium acétate 20mM pH 5 lithium

chlorure 1M contenant 10% d'acétonitrile. Gradient : 0 à 2 min isocratique 20% D, 2 min à 30 min gradient de 20% D à 60% D, débit 1ml/mln).

L'oligonucléotide AH-ODN1 analysé par FPLC dans les conditions ci-dessus présente un temps de rétention  $R_t = 16,4$  min. Dans les mêmes conditions  
5 le conjugué KH-ODN1 présente un temps de rétention  $R_t = 15,4$  min.

On injecte ensuite la totalité de la fraction exclue provenant de la colonne NAP10 (200  $\mu$ l) sur la colonne mono-Q, la fraction correspondant à un temps de rétention de 15 min est collectée, concentrée jusqu'à 300  $\mu$ l et dessalée sur une  
10 colonne NAP10 équilibrée dans un tampon TEAAc 25mM pH7 contenant 10% d'acétonitrile. On élue par le même tampon selon le protocole du fabricant et la fraction exclue est collectée dans un volume de 1 ml. Cette fraction correspond au conjugué KH-ODN1 pur et est caractérisé par un spectre ultra-violet présentant un maximum à 258 nm (composante ODN) est un épaulement vers 305 nm (composante cryptate), le rapport des absorbances  $A_{260}/A_{305} = 4,46$  est proche du  
15 rapport théorique obtenu en faisant le rapport des absorbances molaires des composants du conjugué pris isolément  $\epsilon_{260}(\text{ODN}) + \epsilon_{260}(\text{cryptate}) / \epsilon_{305}(\text{cryptate}) = (135\ 000 + 19\ 000) / 30\ 000 \simeq 5$ .

La structure du conjugué KH-ODN1 est représentée sur la Figure 1.

20 4°) Synthèse d'un conjugué cryptate-Oligonucléotide (K-ODN2) :

On répète la synthèse suivant le protocole ci-dessus en construisant la séquence oligonucléotidique GGG GGT TTT TTT TTT ( $G_5T_{10}$ ) à la place de ACG CCA CTA GCT CC.

### 25 **EXEMPLE 3. Propriétés photophysiques d'un conjugué Oligonucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)] en présence de sérum:**

Méthode A : Les spectres de fluorescences et les durées de vie sont mesurées sur un Spectrofluorimètre Perkin-Elmer de type LS50.

30 On utilise la solution mère de conjugué oligonucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)] obtenue dans l'exemple 2 (3°). En considérant la concentration estimée par mesure d'absorbance  $\epsilon_{260}(\text{conjugué}) = \epsilon_{260}(\text{ODN}) + \epsilon_{260}(\text{cryptate}) \simeq (154\ 000)$  est de  $3,5 \cdot 10^{-6}$  M.



1°) On dilue 200 µl de cette solution mère, soit dans l'eau, soit dans 400 µl de tampon phosphate 100mM pH7 et on mesure le spectre de fluorescence (td = 0,1ms, tg = 0,4ms, λexcitation = 306nm λémission = 540 à 750nm, fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'émission) ainsi que la durée de vie t (td = 0,1 à 0,6 ms, tg=0,4mS, λexcitation = 306nm λémission = 620nm, fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'emission):

Dans l'eau ou dans du tampon phosphate, on observe un profil de spectre différent de celui habituellement observé pour le cryptate [TBP-(Eu3+)]-diamine : la raie principale (λ<sub>em</sub> = 620nm) présente une durée de vie de t<sub>p</sub> = 1,1ms (Coefficient de Corrélation C.C = 0,999).

2°) On dilue 200µl de cette solution mère dans un mélange de 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 et de 200µl de SVNN et on mesure le spectre et la durée de vie dans les même conditions.

On observe que la raie principale (λ<sub>em</sub> = 620nm) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de t<sub>s</sub> = 1,1ms (C.C = 0,99).

Dans ce cas aucune extinction par diminution de la durée de vie n'est observée.

#### Méthode B :

On utilise la solution mère de conjugué oligonucléotide-cryptate[TBP-(Eu3+)] à obtenue dans l'exemple 2 (3°). Par mesure d'absorbance à 260nm, on estime la concentration à 3,5.10<sup>-6</sup> M. On dilue cette solution mère dans du tampon phosphate 100mM afin d'obtenir une concentration finale de 2.10<sup>-8</sup> M.

On remplit les puits d'une microplaque à fond noir (HTRF 96 puits,Packard) selon le protocole suivant :

Conditions 1 : On mélange 100µl de solution mère de conjugué K-ODN1 avec 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 et 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA, les mesures sont effectuées en doublet. Ce milieu permet de constituer une référence.

Conditions 2 : On mélange 100µl de solution mère de conjugué K-ODN1 avec 100µl de SVNN et 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA (mesure en doublet).

On mesure la fluorescence en temps résolu sur un appareil DISCOVERY (Packard) utilisant une excitation laser à 337nm et une fenêtre d'acquisition de 50µs à 400µs.

5 Dans le tampon phosphate seul (conditions 1), on observe que l'intensité de l'émission à 620nm est de  $2,8 \cdot 10^5$  ufa (unités de fluorescence arbitraire). Dans les puits adjacents d'une même microplaque, les solutions contenant du sérum (conditions 2) présentent une intensité de l'émission à 620nm de  $2,8 \cdot 10^5$  ufa.

10 Dans ce cas on n'observe pas de baisse de l'intensité du signal à 620nm en présence de sérum par rapport à la référence dans le tampon phosphate. Il n'y a donc pas de phénomène d'extinction provoqué par le sérum.

L'extinction calculée par la relation suivante est de :

$$100 - 100[E_{620}(\text{sérum}) / E_{620}(\text{réf})] = 100 - 100(2,8 \cdot 10^5 / 2,8 \cdot 10^5) = 0\%$$

15 **EXEMPLE 4. Propriétés photophysiques comparées d'un conjugué Oligonucléotide-cryptate et d'un cryptate [TBP-(Eu3+)] de référence, en présence d'acide urique:**

20 Cet exemple est utilisé pour comparer l'effet de l'acide urique sur les propriétés photophysiques de différentes molécules contenant un motif cryptate d'euprium.

Dans une série de puits d'une microplaque, on pipette des volumes identiques (100µl) soit d'une solution de conjugué marqué au cryptate (environ  $2 \cdot 10^{-8}$  M, voir exemple 3B) que l'on veut évaluer, soit d'une solution de cryptate de référence (environ  $2 \cdot 10^{-8}$  M, voir ex 1B).

25 Dans chaque série de puits on ajoute dans le premier puits (standard 0) 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA et dans les puits suivant 200µl de solutions contenant des concentrations croissantes d'acide urique dans le même tampon (afin d'obtenir par exemple des concentrations finale de 0, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/l d'acide urique).

30 On mesure la fluorescence en temps résolu sur un appareil DISCOVERY (Packard) utilisant une excitation laser à 337nm et une fenêtre d'acquisition de 50µs à 400µs.

Pour chaque série on mesure l'intensité de l'émission à 620nm pour le standard 0 ainsi que pour chaque concentration en acide urique. Pour chaque concentration on évalue le pourcentage d'extinction par la relation suivante:

$$100 - 100[E_{620}(\text{ac. urique}) / E_{620}(\text{standard 0})]$$

5 Les résultats sont regroupés dans le tableau I.

TABLEAU 1

[Acide urique] en mg/l	% d'extinction à 620 nm	
	K-NH2	K-G5T10
0	0	0
1,25	47	8
2,5	66	20
5	79	28
10	86	30
20	88	36
40	89	40
80	90	46

10 On observe que le pourcentage d'extinction du cryptate libre de référence augmente fortement en fonction de la concentration en acide urique. Par contre le pourcentage d'extinction des conjugués cryptate-oligonucléotide est significativement plus bas même pour les fortes concentration en acide urique.

15 En effet, à la concentration de 5mg/ml le cryptate K-NH2 de référence présente une extinction de 79% alors que dans les mêmes conditions le conjugué cryptate-oligonucléotide K-ODN2 ne présente que 28% d'extinction.

**EXEMPLE 5. Synthèse et purification d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-aminohexyl-oligonucléotide-Maléimide:**

Synthèse d'un oligonucléotide de séquence  $G_5T_{10}$  fonctionnalisé en son  
 5 extrémité 5' par un cryptate et en son extrémité 3' par un bras portant un groupe réactif maléimide ( ${}^5K\text{-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{MCCA\text{H}}\text{C T}_{-3}$ ).

La synthèse est réalisée à partir d'un oligonucléotide portant deux bras aminohexyl dont un est protégé (structure générale  $\text{MMT-NH}-(\text{CH}_2)_6-({}^5\text{ODN}_3)-(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2$  suivant le schéma ci-après.

10  $\text{MMT-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{\text{AH}}\text{CT} \rightarrow {}^5\text{MMT-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{MCCA\text{H}}\text{CT}$   
 $\rightarrow {}^5\text{AH GGG GGT TTT TTT TT}^{MCCA\text{H}}\text{CT} \rightarrow ({}^5K\text{-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{MCCA\text{H}}\text{C T}_{-3})$

Un oligodésoxynucléotide (ODN) de séquence  ${}^5\text{MMT-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{\text{AH}}\text{C T}_{-3}$  modifié en son extrémité 5' par un bras aminohexyl (AH) sous sa forme protégée par un groupe Monométhoxytrityl (MMT) est synthétisé suivant le  
 15 procédé suivant :

Par un procédé similaire à l'exemple 1 (1°), sur une colonne T (1  $\mu\text{mol}$ ), on couple le dérivé N,N-diisopropyl- $\beta$ -cyanoethyl-phosphoramidite de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-Trifluoracétamidohexyl)-2'-désoxycytidine, ensuite on poursuit la synthèse en construisant la séquence GGG GGT TTT TTT TT, et  
 20 finalement on effectue le couplage d'un dérivé Monométhoxytrityl-aminohexyl-phosphoramidite (MMT-C6—Aminomodifier, Cruachem) en utilisant l'option « trityl-ON » du synthétiseur. L'oligonucléotide  ${}^5\text{MMT-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{\text{AH}}\text{CT}$  est traité par l'ammoniaque concentrée (16h à 55°C) et purifié par HPLC selon le protocole de l'exemple 1 (1°).

25 L'oligonucléotide partiellement déprotégé ainsi obtenu est concentré (speed-vac), une partie aliquote (0,24  $\mu\text{mol}$ ) est reprise par 100  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate 0,1M pH 8 et traité par 5mg de SMCC (15  $\mu\text{mol}$ ) dans 100  $\mu\text{l}$  d'acétonitrile, Sigma). Après 40 min sous agitation à température ambiante, le mélange est concentré de moitié (speed-vac) et déssalé sur colonne NAP10  
 30 équilibrée dans TEAAc 25mM pH7 5% d'acétonitrile. La fraction exclue (1ml) contenant l'oligonucléotide de structure  ${}^5\text{MMT-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{MCCA\text{H}}\text{CT}$  est évaporée à sec, le résidu est repris par 1 ml d'acide acétique à 80% après 20 min à température ambiante le mélange est concentré et co-évaporé (speed-vac)

par de l'eau puis repris dans 300  $\mu$ l d'eau. On obtient à ce stade l'oligonucléotide détritylé de structure suivante  $5'$ AH GGG GGT TTT TTT TT<sup>MCC-AH</sup>CT.

Cet oligonucléotide (0,175  $\mu$ mol dans 300 $\mu$ l) est dilué par 300 $\mu$ l de TEAB 0,1M pH7 puis on ajoute 450 $\mu$ l (1,27 nmol soit  $\sim$  7 eq.) d'une solution de cryptate [TBP-(Eu3+)] activé (4 mg/ml) comme décrit dans l'exemple 2.

Après 30min sous agitation on évapore sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 200  $\mu$ l, on dépose sur une colonne NAP10 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon TEAAc 25mM pH7 contenant 10% d'acétonitrile et on élue par le même tampon selon le protocole du fabricant. La fraction exclue est collectée dans un volume de 1ml et concentrée (speed-vac) jusqu'à un volume de 200 $\mu$ l. La fraction exclue contient principalement l'oligonucléotide marqué de structure ( $5'$ -K-AH GGG GGT TTT TTT TT<sup>MCC-AH</sup>C T<sub>-3</sub>), cet oligonucléotide est ensuite purifié par injection sur une colonne HR 10/30 remplie de Sephadex G25 éluee par du tampon phosphate 0,1M pH7 avec un débit de 1ml/min. On collecte la fraction éluee entre 8 et 11 min. On obtient ainsi 3 ml d'une solution contenant 17,5 nmol de l'oligonucléotide  $5'$ -K-AH GGG GGT TTT TTT TT<sup>MCC-AH</sup>C T<sub>-3</sub> pur directement utilisable pour être couplé sur les fonctions thiol d'une protéine. (rapport  $A_{260}/A_{305}$  = 7).

#### EXEMPLE 6. Couplage d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-aminohexyl-oligonucléotide-maléimide sur un anticorps:

Un anticorps est fonctionnalisé par du SPDP (Pierce), après réduction par du DTT, l'anticorps activé est purifié sur une colonne HR 10/30 remplie de Sephadex G25 éluee par du tampon phosphate 0,1M pH7 avec un débit de 1ml/min. La fraction contenant l'anticorps activé est combinée avec un conjugué cryptate-oligonucléotide activé par un groupe maléimide  $5'$ -K-AH GGG GGT TTT TTT TT<sup>MCC-AH</sup>C T<sub>-3</sub> préparé selon l'exemple 5. Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur une colonne Superdex 200 éluee comme ci-dessus, la fraction contenant le conjugué anticorps-oligonucléotide-cryptate est collectée.

**EXEMPLE 7. Couplage d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-aminohexyl-oligonucléotide-maléimide sur de la streptavidine:**

La streptavidine est activée comme dans l'exemple 6 et elle est ensuite  
 5 marquée à l'aide d'un conjugué cryptate-oligonucléotide activé par un groupe maléimide <sup>5'</sup>-K-AH GGG GGT TTT TTT TT<sup>MCC-AH</sup>C T<sub>3</sub>, préparé selon l'exemple 5.

**EXEMPLE 8. Propriétés photophysiques d'un conjugué protéine-oligonucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)]:**

10

On évalue le pourcentage d'extinction en présence d'acide urique en suivant le protocole de l'exemple 4.

On évalue ainsi un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-oligonucléotide-anticorps préparé selon le protocole de l'exemple 6 par rapport à un cryptate[TBP-(Eu3+)]-anticorps de référence préparé par marquage d'un anticorps à l'aide de  
 15 cryptate (activé par du SMCC) en suivant un protocole classique d'immunochimie.

On évalue également un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-oligonucléotide-streptavidine préparé selon l'exemple 7 par rapport à un cryptate[TBP-(Eu3+)]-streptavidine de référence préparé par marquage de streptavidine à l'aide de  
 20 cryptate (activé par du SMCC) en suivant un protocole classique d'immunochimie.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 2.

**TABLEAU 2**

[Acide urique] en mg/l	Pourcentage d'extinction du signal du cryptate trisbipyridine à 620 nm	
	Conjugué anti-prolactine cryptate trisbipyridine	Conjugué anti-prolactine oligonucléotide cryptate trisbipyridine
0	0	0
5	46	2
10	61	9
20	71	15
40	82	20
80	86	28

[Acide urique] en mg/l	Pourcentage d'extinction du signal du cryptate trisbipyridine à 620 nm	
	Conjugué streptavidine cryptate trisbipyridine	Conjugué streptavidine oligonucléotide cryptate trisbipyridine
0	0	0
5	74	10
10	88	11
20	94	18
40	97	23
80	97	32

On observe que pour les fortes concentrations en acide urique le conjugué cryptate-anticorps de référence présente une extinction de 86% alors que dans les mêmes conditions, le conjugué cryptate-oligonucléotide-anticorps ne présente que 28% d'extinction. Pour une concentration en acide urique voisine entre 5 et 10mg/ml la fluorescence du conjugué de référence est atténuée de 50% alors que le composé de l'invention présente moins de 10% d'extinction.

On observe de façon analogue que le conjugué cryptate-streptavidine de référence présente dans les conditions de forte concentration en acide urique une extinction de 97% alors que le conjugué cryptate-oligonucléotide-streptavidine ne présente que 32 % d'extinction.

#### **EXEMPLE 9. Couplage d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu<sup>3+</sup>)]-maléimide sur un oligonucléotide-thiol:**

Le cryptate [(bis-bipy)-(bipy-dimethylester)] décrit dans l'exemple 4, section A, de la demande EP 0 321 353 est traité par de l'éthylène diamine et le cryptate-diamine résultant purifié par RP-HPLC est ensuite traité par du SMCC (Pierce) ou du SMP (Pierce) pour introduire un groupe maléimide. On obtient ainsi un conjugué cryptate-maléimide. Ce conjugué cryptate maléimide, purifié sur RP-HPLC est couplé sur un oligonucléotide-thiol (ODN4 ci-dessous).

L'oligonucléotide utilisé possède la structure suivante :

ODN3 : DMT-O(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-SS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-p-d(TTT TTT TTT GGG GG<sup>AH</sup>CG)<sub>3</sub>.

La fonction thiol est introduite en 5' de l'oligonucléotide sous la forme d'un pont disulfure. Cette fonctionnalisation est introduite à la fin en position 5' de l'oligonucléotide par un phosphoramidite (C6-disulphide phosphoramidite, Cruachem Ltd., Glasgow). Après déprotection ammoniacale et purification (RP-HPLC) l'oligonucléotide est traité par le TCEP (Pierce, Rockford, IL) afin de libérer la fonction thiol.

On obtient ainsi l'oligonucléotide de structure :

ODN4 : HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-p-d(TTT TTT TTT GGG GG<sup>AH</sup>CG)<sub>3</sub>.

On ajoute 15µl d'une solution d'ODN3 à 156 UA<sub>260</sub>/ml à 85µl d'eau, on ajoute 50µl d'une solution de TCEP à 1mg/ml, après 20min à 20°C on dépose sur une colonne NAP 10 (équilibrée dans TEAAc 25mM pH7 5% acétonitrile) on élue la colonne et collecte le volume d'exclusion (1ml contenant environ 9nmol d'ODN4) concentre au speed-vac (jusqu'à environ 100µl) et on ajoute 13 nmol de cryptate-maléimide dans 50µl d'eau. Après une nuit de couplage à 4°C, le mélange est purifié sur NAP10 (élution comme ci-dessus) et le conjugué oligonucléotide-cryptate est élué dans le volume d'exclusion (1ml). On vérifie par FPLC analytique l'absence de cryptate libre (colonne HR10/30 remplie de Sepharose G25 (Pharmacia), élution par tampon phosphate 10mM pH 7).

On obtient ainsi le conjugué oligonucléotide-cryptate[TBP-Eu<sup>3+</sup>] de structure [bpy.bpy.bpy-Eu<sup>3+</sup>]-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-p-d(TTT TTT TTT GGG GG<sup>AH</sup>CG)<sub>3</sub>, qui possède près de l'extrémité 3' un bras aminohexyl permettant de lier ce conjugué à une biomolécule.

#### EXEMPLE 10. Propriétés photophysiques d'un conjugué Oligonucléotide-cryptate [TBP-Eu<sup>3+</sup>]). obtenu selon l'exemple 9:

##### A. Durée de vie :

On effectue la mesure de la durée de vie sur une dilution dans l'eau du conjugué cryptat -oligonucléotide obtenu dans l'exemple 9 en utilisant le protocole de l'exemple 3 (méthode A).

On observe que dans l'eau ou dans le tampon phosphate, la raie principale( $\lambda_{em} = 620nm$ ) présente une durée de vie de  $t_p = 1,33ms$  (Coefficient de



Corrélation C.C = 0,999), cette durée de vie élevée est à rapprocher de la valeur de 1,1ms (exemple 3A) obtenue pour le conjugué cryptate-oligonucléotide dont la synthèse est décrite dans l'exemple 2.

B. Extinction par l'acide urique :

5 On évalue le pourcentage d'extinction par l'acide urique comme décrit dans l'exemple 4 afin d'obtenir des concentrations finale de 0, 2,5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/l d'acide urique.

On traite de la même façon un échantillon référence de cryptate libre.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 3 ci-dessous :

10

TABLEAU 3

Acide urique (mg/ml)	Cryptate libre Extinction à 620nm (%)	Conjugué de l'ex. 9 Extinction à 620nm (%)
0	0	0
2,5	81	32
5	92	38
10	97	43
20	98	46
40	98	47
80	98	53

15 On observe que la structure du conjugué cryptate oligonucléotide confère une résistance à l'extinction par l'acide urique du même ordre que ce qui a été observé pour le conjugué de l'exemple 2.

De même la mesure de la durée de vie selon l'exemple 3A montre que la raie principale ( $\lambda_{em} = 620nm$ ) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de  $t_s = 1,1ms$  (C.C = 0,99).

20

Par conséquent, la façon de créer la liaison covalente entre l'unité cryptate et l'oligonucléotide n'influe pas de façon sensible sur les propriétés photophysiques des conjugués.

**EXEMPLE 11. Couplage d'un conjugué cryptate[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu<sup>3+</sup>)]-maléimide sur un oligonucléotide-thiol:**

Dans cet exemple on utilise un cryptate formé de deux unités 4,4'-diéthoxy-  
5 2,2'-bipyridines et d'une unité 4,4'-di-méthylcarboxylate-2,2'-bipyridine. La synthèse de ce cryptate est faite selon le procédé décrit dans la demande EP 0 321 353, par condensation, en présence de carbonate de sodium dans l'acétonitrile à reflux, de 2 équivalents de 6,6'-dibromométhyl-4,4'-diéthoxy-2,2'-2,2'-bipyridine et 1 équivalent de dérivé 6,6'-di-aminométhyl-4,4'-diméthylcarboxylate-2,2'-bipyridine. On obtient  
10 ainsi le cryptate [bis-diéthoxybpy. diCOOCH<sub>3</sub>bpy]NaBr. Ce cryptate de sodium est ensuite converti en cryptate d'euporium [bis-diéthoxybpy.diCOOCH<sub>3</sub>bpy-Eu<sup>3+</sup>] par EuCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dans le méthanol à reflux. Ce cryptate-diméthylester d'euporium est ensuite traité par de l'éthylène diamine (4h à 20°C), le cryptate-diamine d'euporium [bis-diéthoxybpy.(di-NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-bpy)-Eu<sup>3+</sup>] résultant est purifié par RP-HPLC.

15 Ce cryptate servira de cryptate de référence et sera appelé K'NH<sub>2</sub> dans l'exemple 12 ci-dessous. Il est ensuite traité par du SMP (Pierce) pour introduire un groupe maléimide. On obtient ainsi un conjugué cryptate [bis-diéthoxybpy.bipy-Eu<sup>3+</sup>]-maléimide. Ce conjugué cryptate-maléimide, purifié sur RP-HPLC est couplé selon le protocole de l'exemple 9 sur l'oligonucléotide-thiol ODN4 décrit dans cet exemple. On  
20 obtient ainsi un conjugué oligonucléotide-[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu<sup>3+</sup>)]. Le spectre UV de ce conjugué présente un maximum vers 260nm correspondant à l'oligonucléotide et 2 épaulements vers 305 nm et 337nm correspondant à la partie cryptate.

**EXEMPLE 12. Propriétés photophysiques du conjugué oligonucléotide-cryptate[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu<sup>3+</sup>)] obtenu selon l'exemple 11 :**

25 On effectue les mesures de durée de vie du conjugué oligonucléotide-cryptate[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu<sup>3+</sup>)] (exemple 11) dans le tampon phosphate, selon le protocole décrit dans l'exemple et en utilisant comme cryptate de référence  
30 le composé K'NH<sub>2</sub> décrit dans l'exemple 11.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 4 ci-dessous :

TABLEAU 4

Milieu	Conjugué oligonucléotide- cryptate[bis-diethoxybpy.bpy- (Eu3+)]	K'NH2
	Durée de vie (ms)	Durée de vie (ms)
Phosphate	0,8	0,6
Phosphate + sérum	0,8	0,2

- On observe donc que le K'NH2 de référence mis en présence de sérum montre un phénomène d'extinction qui se traduit par une baisse significative de la
- 5 durée de vie en comparaison avec la valeur observée dans le phosphate seul.

On observe que le conjugué oligonucléotide-cryptate[bis-diethoxybpy.bpy-(Eu3+)] n'est pas affecté par le sérum.

Cet exemple montre que l'effet protecteur de la partie oligonucléotide est indépendante de la structure du cryptate.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure dans un dosage par fluorescence d'un analyte mettant en œuvre au moins  
5 un marqueur fluorescent, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de mesure un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que  
10 l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que  
l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides ou d'unités analogues de nucléotide modifiées sur le sucre ou sur la base, liées entre elles par des liaisons internucléotidiques naturelles de  
15 type phosphodiester, une partie des liaisons internucléotidiques étant éventuellement remplacée par des liaisons phosphonate, phosphoramide ou phosphorothioate.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que  
20 l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement comprenant à la fois des unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et des unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'oligonucléotide est constitué d'unités ribonucléotides ou  
25 désoxyribonucléotides, dont l'une au moins peut comporter un groupe fonctionnel introduit ou généré sur ladite unité ou un groupe fonctionnel introduit à l'aide d'un bras d'espacement lié au groupement phosphate terminal en position 3' ou 5'.

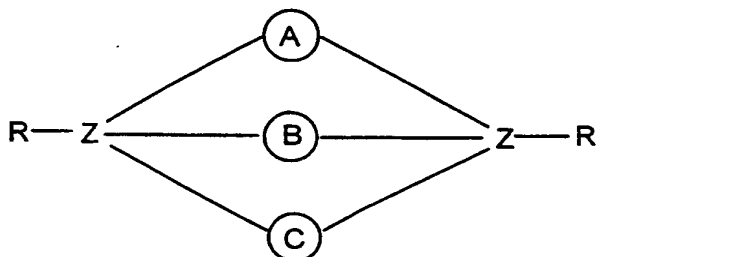
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite unité est l'unité 5' terminale ou 3' terminale.

30 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend un enchaînement de 5 à 50 nucléotides ou un enchaînement de 5 à 50 nucléotides et analogues de nucléotides, ou de nucléosides.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et d'unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide, ledit  
 5 oligonucléotide comprenant au moins 5 liaisons internucléotidiques de type phosphodiester à l'extrémité destinée à être liée au cryptate.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est lié de manière covalente à l'oligonucléotide soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule



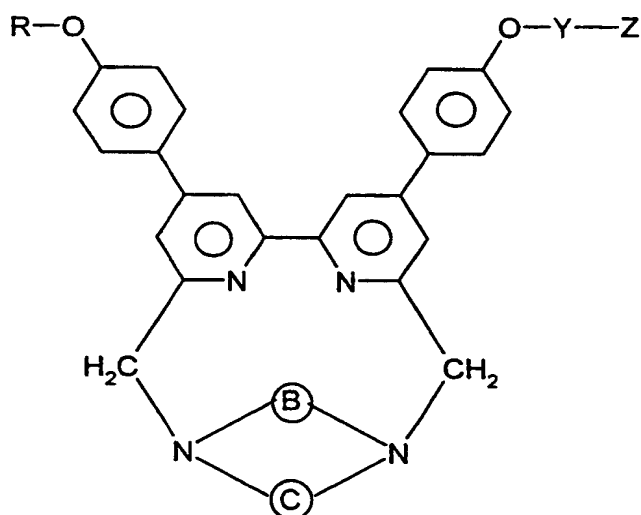
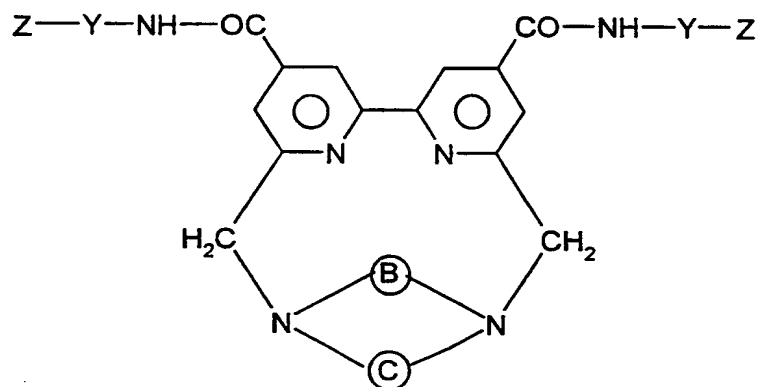
15 dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un  
 20 hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

11. Procédé selon la revendications 10, caractérisé en ce que le cryptate  
 25 de terre rare est constitué d'un sel de terre rare complexé par l'un des composés macrocycliques ou macropolycycliques ci-après :

(22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ;  
 (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ;  
 (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-

phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-bipyridine diphénylbipyridine ; un composé macropolycyclique comprenant un motif moléculaire choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des groupements N-oxydes.

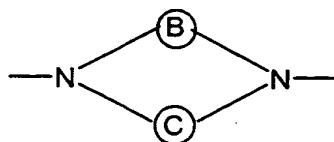
- 5 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :



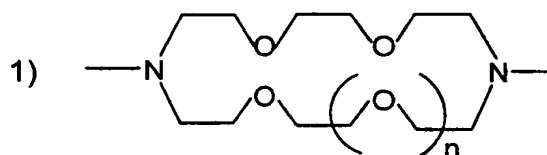
10

dans lesquels :

- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :

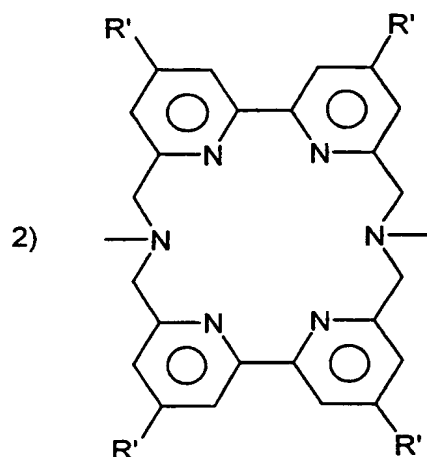


$n = 0$  ou  $1$

macrocycle  $[N_2O_4]$  ou cycle (22)

macrocycle  $[N_2O_3]$  ou cycle (21)

5



macrocycle bis-bipyridine

- Y est un groupe ou un bras d'espaceur qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en  $C_1$  à  $C_{20}$  contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou éventuellement contenant par un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; parmi les groupes cycloalkylène en  $C_5$  à  $C_8$  ou parmi les groupes arylène en  $C_6$  à  $C_{14}$ , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

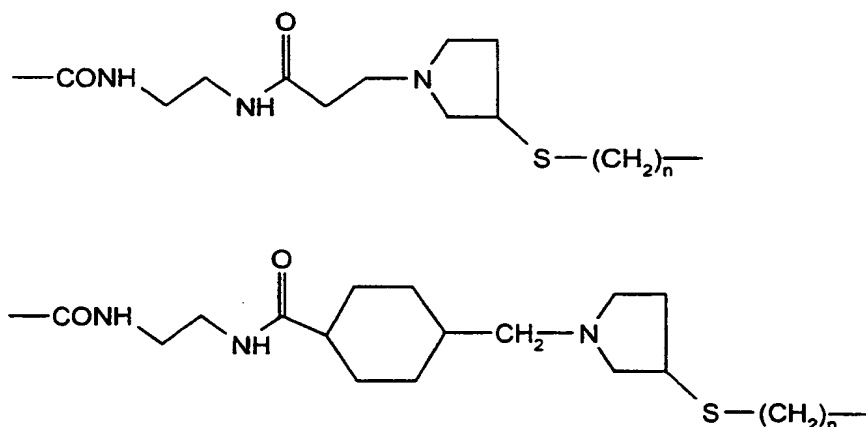
- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>10</sub> et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est lié à l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> et les groupes arylène en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le bras d'espacement est choisi parmi les groupes :



dans lesquelles  $n = 2$  à  $6$ , et  $\text{---CONH---(CH}_2\text{)}_6\text{---}$ , la liaison via le groupe -CONH ayant lieu au niveau du cryptate.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est un cryptate d'euprium.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est le cryptate d'euprium Eu trisbipyridin ou Eu [bis-diéthoxybipyridine.bipyridine] .



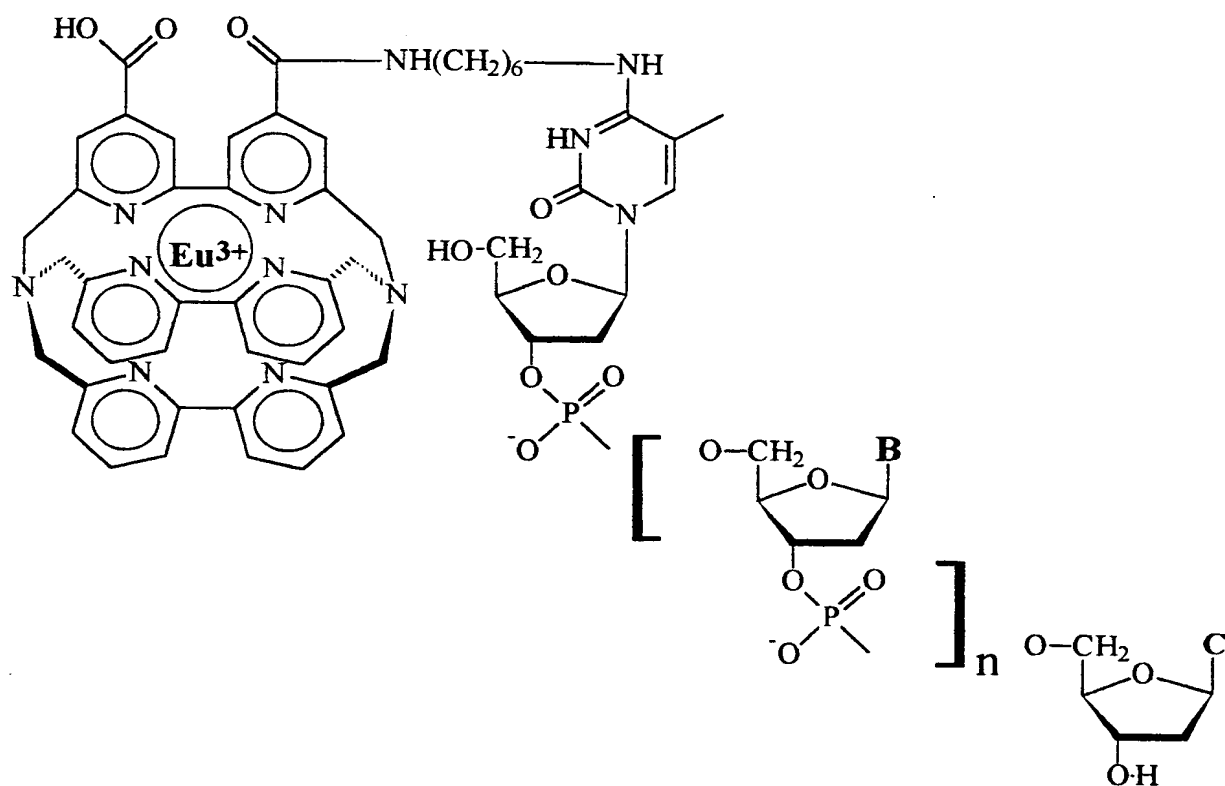
17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le conjugué fluorescent est utilisé comme seul marqueur ou comme l'un des marqueurs fluorescents dans le dosage.

5 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que le conjugué fluorescent est lié de manière covalente à l'un des membres d'un couple de molécules capables de se lier spécifiquement entre elles, en particulier un récepteur cellulaire, un antigène, un anticorps ou un acide nucléique.

10 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'en plus dudit conjugué fluorescent, on met en œuvre dans le dosage un marqueur fluorescent comprenant un composé fluorescent accepteur.



Figure 1



Conjugué KH-ODN1

B = Adénine (A), Guanine (G), Cytosine (C), Thymine (T)

C = Cytosine



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/FR 00/00608

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/58 G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 340 675 A (PERKIN ELMER CORP) 8 November 1989 (1989-11-08) the whole document	1-19
A	E LOPEZ, C CHYPRE, B ALPHA, G MATHIS: "Europium(III) Trisbipyridine Cryptate Label for the Time-Resolved Fluorescence Detection of Polymerase Chain Reaction Products Fixed on a Solid Support" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 2, 1993, XP002125037 cited in the application figures 1,2	1-19



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2000

Date of mailing of the international search report

27/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/FR 00/00608

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>I JEMMILÄ: "Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays"            CLINICAL CHEMISTRY,            vol. 31, no. 3, 1985, pages 359-370,            XP002125038            cited in the application            page 362, column 2, paragraph 2 -page 363,            column 2, paragraph 1</p>	1-19
A	<p>G MATHIS: "Rare Earth Cryptates and Homogeneous Fluoroimmunoassays with Human Sera"            CLINICAL CHEMISTRY,            vol. 39, no. 9, 1993, pages 1953-1959,            XP002125039            cited in the application            the whole document</p>	1-19
A	<p>EP 0 321 353 A (ORIS SA)            21 June 1989 (1989-06-21)            cited in the application            page 20, line 15 - line 41; example D</p>	1-19
P,A	<p>FR 2 769 315 A (CIS BIO INT)            9 April 1999 (1999-04-09)            examples 1-6</p>	1-19
A	<p>EP 0 851 228 A (LAB OF MOLECULAR BIOPHOTONICS) 1 July 1998 (1998-07-01)            abstract; figure 1A</p>	
A	<p>US 4 748 111 A (CROTHERS DONALD M ET AL)            31 May 1988 (1988-05-31)            the whole document</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/FR 00/00608

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0340675	A	08-11-1989	US 4962045	A 09-10-1990
			CA 1330030	A 07-06-1994
			DE 68923035	D 20-07-1995
			DE 68923035	T 19-10-1995
			JP 2017445	A 22-01-1990
			JP 2732892	B 30-03-1998
EP 0321353	A	21-06-1989	FR 2624862	A 23-06-1989
			AT 76410	T 15-06-1992
			AU 2908889	A 19-07-1989
			CA 1334026	A 17-01-1995
			DE 3871353	A 25-06-1992
			ES 2043874	T 01-01-1994
			FI 92698	B 15-09-1994
			WO 8905813	A 29-06-1989
			JP 2866419	B 08-03-1999
			JP 3502575	T 13-06-1991
			KR 133732	B 21-04-1998
			RU 2074859	C 10-03-1997
			US 5457185	A 10-10-1995
			US 5534622	A 09-07-1996
			US 5162508	A 10-11-1992
			US 5346996	A 13-09-1994
FR 2769315	A	09-04-1999	AU 9355698	A 27-04-1999
			WO 9918114	A 15-04-1999
EP 0851228	A	01-07-1998	AU 2980397	A 07-01-1998
			WO 9747968	A 18-12-1997
US 4748111	A	31-05-1988	AU 578933	B 10-11-1988
			AU 3943485	A 19-09-1985
			CA 1222706	A 09-06-1987
			DK 110885	A 13-09-1985
			EP 0154884	A 18-09-1985
			ES 541077	D 16-04-1986
			ES 8606653	A 01-10-1986
			FI 850925	A 13-09-1985
			IL 74539	A 31-01-1989
			JP 60226900	A 12-11-1985
			NO 850769	A 13-09-1985
			NZ 211366	A 30-05-1988
			ZA 8501797	A 27-11-1985





# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00608

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 G01N33/58 G01N33/533

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C12Q C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 340 675 A (PERKIN ELMER CORP) 8 novembre 1989 (1989-11-08) le document en entier	1-19
A	E LOPEZ, C CHYPRE, B ALPHA, G MATHIS: "Europium(III) Trisbipyridine Cryptate Label for the Time-Resolved Fluorescence Detection of Polymerase Chain Reaction Products Fixed on a Solid Support" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 2, 1993, XP002125037 cité dans la demande figures 1,2	1-19

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 00/00608

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	I HEMMILÄ: "Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 31, no. 3, 1985, pages 359-370, XP002125038 cité dans la demande page 362, colonne 2, alinéa 2 -page 363, colonne 2, alinéa 1	1-19
A	G MATHIS: "Rare Earth Cryptates and Homogeneous Fluoroimmunoassays with Human Sera" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 9, 1993, pages 1953-1959, XP002125039 cité dans la demande le document en entier	1-19
A	EP 0 321 353 A (ORIS SA) 21 juin 1989 (1989-06-21) cité dans la demande page 20, ligne 15 - ligne 41; exemple D	1-19
P,A	FR 2 769 315 A (CIS BIO INT) 9 avril 1999 (1999-04-09) exemples 1-6	1-19
A	EP 0 851 228 A (LAB OF MOLECULAR BIOPHOTONICS) 1 juillet 1998 (1998-07-01) abrégé; figure 1A	
A	US 4 748 111 A (CROTHERS DONALD M ET AL) 31 mai 1988 (1988-05-31) le document en entier	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demar. : Internationale No

PCT/FR 00/00608

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famill de brevet(s)	Date de publication
EP 0340675 A	08-11-1989	US 4962045 A	09-10-1990
		CA 1330030 A	07-06-1994
		DE 68923035 D	20-07-1995
		DE 68923035 T	19-10-1995
		JP 2017445 A	22-01-1990
		JP 2732892 B	30-03-1998
EP 0321353 A	21-06-1989	FR 2624862 A	23-06-1989
		AT 76410 T	15-06-1992
		AU 2908889 A	19-07-1989
		CA 1334026 A	17-01-1995
		DE 3871353 A	25-06-1992
		ES 2043874 T	01-01-1994
		FI 92698 B	15-09-1994
		WO 8905813 A	29-06-1989
		JP 2866419 B	08-03-1999
		JP 3502575 T	13-06-1991
		KR 133732 B	21-04-1998
		RU 2074859 C	10-03-1997
		US 5457185 A	10-10-1995
		US 5534622 A	09-07-1996
		US 5162508 A	10-11-1992
		US 5346996 A	13-09-1994
FR 2769315 A	09-04-1999	AU 9355698 A	27-04-1999
		WO 9918114 A	15-04-1999
EP 0851228 A	01-07-1998	AU 2980397 A	07-01-1998
		WO 9747968 A	18-12-1997
US 4748111 A	31-05-1988	AU 578933 B	10-11-1988
		AU 3943485 A	19-09-1985
		CA 1222706 A	09-06-1987
		DK 110885 A	13-09-1985
		EP 0154884 A	18-09-1985
		ES 541077 D	16-04-1986
		ES 8606653 A	01-10-1986
		FI 850925 A	13-09-1985
		IL 74539 A	31-01-1989
		JP 60226900 A	12-11-1985
		NO 850769 A	13-09-1985
		NZ 211366 A	30-05-1988
		ZA 8501797 A	27-11-1985



1  
2  
3

4  
5